

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-330609

(43)Date of publication of application : 30.11.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
B01D 11/02  
B01D 15/08  
// G01N 33/577

(21)Application number : 2000-150181

(71)Applicant : FUJI CHEMICAL INDUSTRIES LTD

(22)Date of filing : 22.05.2000

(72)Inventor : SAKATA KAZUTO  
FUJIMOTO NOBORU  
TADA MASAHIRO  
OKAMOTO KOSEI

## (54) MEASURING METHOD OF DIOXIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To develop a means for simply and rapidly measuring the concentration of dioxins in exhaust gas, wastewater, incineration ash, soil, organism, food or the like in a large quantity at a low cost.

SOLUTION: A dioxin component is subjected to a high-speed solvent extraction method from a sample to be analyzed, the obtained extract is subsequently subjected to clean-up treatment, and an immunoassay method is adapted to the obtained sample to measure dioxins to simply and rapidly measure the concentration of dioxins in a large quantity.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

\*NOTICES\*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In-the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The measuring method of the dioxin which gives a dioxin component to a high-speed solvent extraction method from the sample for analysis, carries out simple clean-up processing of the extract subsequently obtained, and is characterized by measuring dioxin by immunoassay per [ which was obtained ] sample.

[Claim 2] Simple clean-up processing is an approach according to claim 1 characterized by using a multilayer silica gel column chromatography and an alumina column chromatography.

[Claim 3] A multilayer silica gel column chromatography is an approach according to claim 2 characterized by being what performed using a multilayer bulking agent packed column.

[Claim 4] An alumina column chromatography is an approach according to claim 2 characterized by being what performed using a multilayer bulking agent packed column.

[Claim 5] The approach according to claim 3 or 4 characterized by being that by which the filter is arranged in the format that a multilayer bulking agent packed column is the format which sandwiches a bulking agent layer, and fixes migration of this bulking agent layer to prevention or this column substantially.

[Claim 6] The approach according to claim 5 characterized by these filters being a quartz fiber filter and/or a glass fiber filter.

[Claim 7] A multilayer bulking agent packed column is the approach of any 1 publication of claims 3-6 characterized by being the thing of a disposable type.

[Claim 8] (A) The high-speed solvent extraction equipment for extracting a dioxin component from the sample for analysis, and (B) The multilayer silica gel column for carrying out simple clean-up processing of the extract obtained by this extractor, an alumina column, and (C) Dioxin measuring device characterized by having equipment for carrying out immunological measurement of this sample by which simple clean-up processing was carried out.

[Claim 9] The gaging system of the dioxin which extracts a dioxin component from the sample for analysis with a high-speed solvent extraction method, carries out simple clean-up processing of the obtained extract, and is characterized by measuring the sample obtained next by immunoassay.

[Claim 10] The system according to claim 9 characterized by using the multilayer bulking agent packed column packed beforehand for simple clean-up processing.

---

[Translation done.]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention is the dioxin and/or polychlorinated biphenyl in smoke eliminating, exhaust gas, wastewater, incinerated ash, trash, soil, food, animals and plants, etc. (PCB kind) Concentration can be measured simply and quickly and it is related with the equipment and this gaging system the analysis measuring method which also makes possible the quantum which the actuation is also simple, is exact, and can trust it still more cheaply, and for it.

[0002]

[Description of the Prior Art] Dioxin has been the exact analysis measurement and the technical problem that a quantum is big, as an environmental pollutant. With incineration of dust, it is contained during smoke eliminating or dioxin is not only the pollutants which were being mixed in agricultural chemicals etc., but it poses a problem with big existing in still more various trash, such as incinerated ash, and polluting water, atmospheric air, and soil. Dioxin is the social-problem-ized compounds serious as what gives not only the body but a large operation harmful to animals and plants as environmental hormone, and also destroys natural environment. Therefore, although the dioxin's existence gestalt is various, the quantum of the dioxin which existing in a minute amount is also exact, and it can trust from producing big problems -- toxicity is strong -- is needed. The dioxin set as the object of regulation in Japan although generally called dioxin is Pori chlorination dibenzo dioxin. (PCDD) Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) They are some isomers. At PCDD, an isomer is 135 in 75 and PCDF. There is an isomer. Moreover, in the West, it is 209. Polychlorinated biphenyl with an isomer (PCB) About 12 strong toxic kinds, it was called coplanar [ PCB ] (Co-PCB) also in some, and has included in dioxin. In order to express the concentration of dioxin, it is usually 2, 3 and 7 with the strongest toxicity, and 8-tetra-chloro dibenzo. -p-dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD) Equivalence toxicity concentration converted into toxicity (TEQ) It is shown.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although measurement and analysis of dioxin and/or PCBs are the separation quantitative analyses of a super-minute amount fundamentally, strict quality control is required. Moreover, compaction of analysis time amount, automation, and a cost cut are also important technical problems. It becomes measurement and analysis of dioxin and/or PCBs from the third process which carries out the analysis quantum of the second process which separates the first process which mainly extracts dioxin and/or PCBs from a sample (sample) using a solvent, the matter contained in an extract, dioxin, and/or PCBs and the dioxin which were separated, and/or the PCBs. It not only uses reagents, such as a lot of solvents, but in the case of a general Soxhlet extraction, in this, a solid sample takes 16 hours or more to extract time amount by the extract (the first process) of the dioxin as pretreatment of a sample, and/or PCBs. The extract which usually requires these 16 hours or more is performed by dividing on the 2nd, and when it combines with the processing which removes a solvent, serious long duration will be required. As dioxin was described above, although the gestalt of the sample is various, since it is separation analysis actuation of a super-minute amount, it needs very complicated actuation as there is nothing with how often also from the solvent used for the device which avoids adhesion in a container wall, waste fluid, or extract processing and recovery processing must be carried out. Furthermore, if the dioxin in exhaust gas, wastewater, soil, incinerated ash, etc. tends to be analyzed and it is going to show the concentration, each of the isomer of dioxin which poses a problem must be measured and integrated. At the third process, it is usually gas chromatograph-mass spectrometer. (GC-MS) Although it is used, in order to analyze dioxin for every isomer, it is the GC-MS. The measurement can be performed only using the thing of a high resolution. High-resolution GC-MS which can analyze dioxin It is very expensive and is about

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

100 in Japan. The present condition is only carrying out base extent spread. Moreover, the GC-MS There are measurement to be used and a problem that it analyzes if not based on a person with specific skill, and results cannot be achieved.

[0004]

[Means for Solving the Problem] The dioxin which may be contained in them for various samples, and/or PCBs reach to an extreme. A minute amount by quick and low cost As a result of taking lessons from the approach of giving a reliable result and advancing research wholeheartedly, dioxin and/or PCBs are extracted from a sample (sample) using a solvent (the first process). In the measuring method of the dioxin it is incomparable from separating the matter, the dioxin, and/or PCBs which are contained in an extract (the second process), and carrying out the analysis quantum of the dioxin and/or PCBs which were separated (the third process), and/or PCBs By adopting simple clean-up processing as a high-speed solvent extraction method and the second process, and adopting immunoassay as the third process as the first process, it found out that the outstanding advantage was acquired and this invention was completed.

[0005] Namely, this invention [1] Measuring method of the dioxin which gives a dioxin component to a high-speed solvent extraction method from the sample for analysis, carries out simple clean-up processing of the extract subsequently obtained, and is characterized by measuring dioxin by immunoassay per [ which was obtained ] sample;

[2] Simple clean-up processing is the approach of the above-mentioned [1] publication characterized by using a multilayer silica gel column chromatography and an alumina column chromatography.;

[3] A multilayer silica gel column chromatography is approach [ of the above-mentioned [2] publication characterized by being what performed using a multilayer bulking agent packed column ]; [4]. An alumina column chromatography is the approach of the above-mentioned [2] publication characterized by being what performed using a multilayer bulking agent packed column.;

[5] Approach the above [3] characterized by being that by which the filter is arranged in the format that a multilayer bulking agent packed column is the format which sandwiches a bulking agent layer, and fixes migration of this bulking agent layer to prevention or this column substantially, or given in [4];

[0006] [6] The approach of the above-mentioned [5] publication characterized by these filters being a quartz fiber filter and/or a glass fiber filter;

[7] A multilayer bulking agent packed column is the approach of any 1 publication of above-mentioned [3]- [6] characterized by being the thing of a disposable type.;

[8] (A) The high-speed solvent extraction equipment for extracting a dioxin component from the sample for analysis, and (B) The multilayer silica gel column for carrying out simple clean-up processing of the extract obtained by this extractor, an alumina column, and (C) Dioxin measuring device characterized by having equipment for carrying out immunological measurement of this sample by which simple clean-up processing was carried out;

[9] gaging-system [ of the dioxin which extracts a dioxin component from the sample for analysis with a high-speed solvent extraction method, carries out simple clean-up processing of the obtained extract, and is characterized by to measure the sample obtained next by immunoassay ];, and [10] The system of the above-mentioned [9] publication characterized by to use the multilayer bulking agent packed column packed beforehand for simple clean-up processing offers.

[0007] Probably, the purpose of others of this invention, the description, excellency, and its viewpoint that it has will be clearer to this contractor than the following publications. However, please understand that the publication of this specification including the following publications and the publication of a concrete example etc. is what shows the desirable mode of this invention and is shown only for explanation. Probably, it will be easily clear to this contractor by the knowledge from the parts of the following publications and others of this specification to make various change and/or alterations (or qualification) by the intention of this invention indicated on these specifications and within the limits. All the patent reference and bibliographies that are quoted on these specifications are quoted for the purpose of explanation, and as some of these specifications, they include the contents here and should be interpreted.

[0008]

[Embodiment of the Invention] Generally it is high-speed solvent extraction as the inside of this specification, and "a high-speed solvent extraction method". (AcceleratedSolvent Extraction; ASE) By the approach called From the sample with which the cel was filled up, an organic solvent The elevated temperature more than the boiling point (For example, 50-200 \*\*) It is the approach of extracting quickly under the conditions of /high pressure (for

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



example, 1500 – 2000 psi = about 105 – 141 kgf/cm<sup>2</sup>, however 1 psi = about 0.070307 kgf/cm<sup>2</sup>). this ASE a technique — \*\*\*\*\* No. 5,843,311 (USP No.5,843,311) the [ international public presentation ] — it can carry out by the same approach or the changing method substantially with the approach given in reference or them which were quoted an approach given in a No. 95/34360 specification (WO 95/34360) etc., or there (the publication in them is included in the indication of this specification by referring to it) . the equipment which furthermore fitted ASE — \*\*\*\*\* No. 5,785,856 (USP No.5,785,856) \*\*\*\*\* No. 5,647,976 (USP No.5,647,976) (they are [ equipment given in reference, the approach or them which were quoted equipment given in these reference etc., and there / its / operation or there /, and ] the same equipment and an approach (equipment and the approach which were changed) substantially) There is an indication. It contains. If it is this contractor, selection use can also be carried out suitably (the publication in this reference is included in the indication of this specification by referring to it). .

[0009] this invention is followed — Co-PCB the included dioxin — a sample to ASE In order to extract by law, it is desirable to carry out on the following conditions. first — although extract temperature is based also on the extract organic solvent to be used — usually — the elevated temperature more than the boiling point of a use solvent, for example, 80–250 \*\*, -- it is -- more -- desirable -- You may be 100–200 \*\*. By the case where toluene or 5 % acetic-acid content toluene is used as an extracting solvent in a typical example, extract operation can be preferably carried out in 150 – 200 \*\*, and extract operation can be preferably carried out in 150 \*\* by the case where an acetone is used as an extracting solvent. When decomposition of a request component needs to be avoided, low temperature is chosen suitably. Although based also on the extract organic solvent to be used as a pressure at the time of an extract, it is usually 80 – 250 kgf/cm<sup>2</sup>. For example, 100 – 200 kgf/cm<sup>2</sup> It can be used preferably and is 130 – 150 kgf/cm<sup>2</sup> as a typical extract pressure. It is desirable. As an extracting solvent, since the dioxin which includes Co-PCB, for example is lipophilicity, it is desirable to use an organic solvent. Although the solvent which mixed the organic solvent with the miscibility of toluene, benzene, an acetone, or an acetic acid to them as a typical extracting solvent, for example is mentioned, the thing of advantageous description can be used in this invention, choosing it suitably, without being limited to these. Moreover, the extracting solvent also needs to enable it to treat a sample for measurement of the dioxin by next immunoassay in an aqueous medium, and since the processing converted into the solvent suitable for this is needed, it chooses the solvent suitable for this. also performing extract processing to one sample repeatedly -- possible -- for example, -- 1 or two or more cycles are applicable. Suitably, it is 2. Or 3 Although extract processing of a cycle is performed, the number of cycles can be fluctuated suitably.

[0010] ASE According to each sample, beforehand, law can conduct an experiment etc. and can determine the optimal extraction condition, for example, the class of solvent, extract temperature, extract time amount, an extract pressure, an extract cycle, etc. ASE The equipment to perform is CPU. And you may have the computer which carried memory, and according to the program decided beforehand, such equipment can be set up so that the optimal extract can be performed. Moreover, this equipment is possible also for changing an extraction condition for each sample of every, for example, enables full operation of 24 hours while it can automate the actuation. By using such equipment, it becomes possible to attain sharply the simplification of compaction of time amount, extensive processing, and actuation, low-cost-izing, and laborsaving. high-speed solvent extraction equipment — die ONEKUSU (Dionex Corporation, CA, USA) from — it can obtain, and although what carried out program control of the necessary processing to the automation list can use it preferably, if it becomes, there will be especially nothing from which an advantageous advantage is acquired according to this invention and that is limited. When moisture exists by soil, an organism origin sample, etc., extracting, after carrying out moisture removal or processing with a water-soluble solvent, or adding a thing device can also be adopted as arbitration. Moreover, an extracting solvent may be chosen and a specific component may be alternatively extracted to arbitration. Moreover, when dioxin needs to be extracted also from the interior of a sample, processing with a hydrochloric acid etc. in advance is also possible.

[0011] Measurement and analysis of dioxin and/or PCBs are the separation quantitative analyses of a super-minute amount fundamentally, and while strict quality control is required, it is a technical problem also with important compaction of analysis time amount, automation, and cost cut. It not only uses reagents, such as a lot of solvents, but in the case of a general Soxhlet extraction, in this, a solid sample takes 16 hours or more to extract time amount by the extract of the dioxin as pretreatment of a sample, and/or PCBs. The extract which usually requires these 16 hours or more is performed by dividing on the 2nd. On the other hand, for example, even if it requires a long time more, it can be made to complete even in about at most 4 hours for 30 minutes to about 2 hours according to the above-mentioned high-speed solvent extraction method. That is, even if it

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

requires for an extract by this invention for about 2 hours, extract time amount is 8 about 1/. It can be sharply shortened to extent.

[0012] Abundance of dioxin when organic substances, such as a variety of organic compounds, generally exist in an environmental sample, and/or PCBs ppb-ppq It is necessary to remove the compound which has active jamming or effect on analysis of dioxin as much as possible, suppressing loss of dioxin and/or PCBs as much as possible, in order to perform positive measurement, since it is ultralow volume called order. Also for this reason, clean-up actuation is very important. There are not few compounds which much organic substance exists in a specimen and block analysis of dioxin. The abundance of an aromatic series component is high concentration overwhelmingly as compared with dioxin, and the effect on analysis is especially large. Then, although processing by the sulfuric acid was added for the purpose except such an active jamming component etc. As what gathered the working efficiency and considered the safety of an activity etc. further as what is replaced with it Moreover, in order to eliminate this since analysis of a predetermined dioxin component is blocked greatly if it analyzes containing the sulfur of a simple substance etc. in incinerated ash, or a part of sludge and others, and not removing this sulfur, As a thing in which processing by the silver nitrate is also possible to coincidence, processing by the multilayer silica gel column chromatography is made. In this multilayer silica gel column chromatography, the device silica gel column processing aiming at the removal of a strong polar substance included in a sample solution is made by whose coincidence is also usually made.

[0013] Next, alumina column chromatography processing of this sample by which multilayer silica gel column chromatography processing was carried out is carried out. For the removing-the interfering substance which lives together in such extract purpose For example, a silica gel column given in "\*\* and a dioxin measurement manual (resource environmental cure separate volume volume [ 34th ] No. 13)", How to make the interfering substance which lives together combining a multilayer silica gel column or an alumina column stick to a bulking agent, and to remove it, "PCB processing technical guidebook (edit foundation Japan Industrial Waste Management Foundation —) Issue It uses combining the silica gel column of Gyosei", a multilayer silica gel column, an alumina column, a FUROJIRIRU column, an activated carbon column, etc., and the method of making the interfering substance which lives together stick to a bulking agent, and removing it etc. is mentioned. By the way, although glass is used for the column quality of the material, and silica wool is used for a column outlet by the above-mentioned approach in order to prevent the outflow of a bulking agent, the silica wool or the filter for neither a quartz fiber filter nor a glass fiber filter being used, and preventing migration and mixing of a bulking agent at the boundary part or the topmost part of a bulking agent are not used. Again. In order to adjust the rate of flow, the column which equipped the column outlet with the cock is used, and it is the rate of flow 2.5 mL/It is adjusting to the part. However, such conventional dioxin and conventional PCB Since the measure for migration prevention of a bulking agent is not taken, a bulking agent will leak or the column for carrying out clean-up of the kind etc. will be mixed, if a column is sideways carried out after restoration or it falls. It is dioxin and PCB that the measure for migration prevention of this bulking agent is not taken, if adhesives, a plastics presser foot, etc. are used in order to fix a filter and silica wool in a column. It is because a kind sticks to it and exact measurement becomes impossible. For this reason, since a column cannot be filled up with a bulking agent and cannot move it to somewhere else before use from the location with which it was filled up, it cannot usually perform use in the location which cannot perform column restoration of a sample extraction location etc.

[0014] In the desirable mode according to this invention, the column with which it is the format which sandwiches a bulking agent layer, and the filter is arranged in the format which fixes migration of this bulking agent layer to prevention or this column substantially is used. That is, the rate of flow can be adjusted by holding a bulking agent in a column by adjusting the number of sheets of the filter which can manufacture a movable column also after restoration of a bulking agent, and is inserted by fixing a filter to a column according to the frictional force of the outer wall of a column, and a filter deep pool. This column is a multilayer bulking agent packed column characterized by putting in the filter which is the configuration same at the boundary part and/or the topmost part of the outlet of a column, and a bulking agent as the cross section of a column, and can be fixed in a column according to frictional force with a filter deep pool with a column wall, and preventing migration of a bulking agent in the open column filled up with two or more sorts of bulking agents in the shape of a layer. Although an open column is used for this column, glass, a quartz, stainless steel, and a fluororesin can be used for it as a material of the outer case of an open column. Among these, a desirable thing is dioxin and PCB. It is glass which does not almost have adsorption of a kind etc. As a cross-section configuration of an open column, the thing of arbitration can be used according to applications, such as circular, an ellipse form, a square, and a triangle. Among these, the desirable thing is easy to process it and is circular. These open columns can make easy to extract the solution

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

which passed the column by making the path of an outlet thin. The size and die length of an open column can be set as arbitration according to the amount of the bulking agent with which it is filled up. When the amount of a bulking agent is the same, the pressure loss of the liquid passed, so that the size of a column becomes thick becomes small, the rate of flow becomes early, if it is conversely made thin, pressure loss will become large and the rate of flow will become slow. Moreover, since pressure loss changes also with the particle diameter and consistencies of a bulking agent, the size of a column can be set up so that it may become the rate of flow for which are most suitable. In the amount of the bulking agent of the usual clean-up column, it is bore 5 mm to 30 mm. With the column of a circular cross section, die length is 5 cm to 30 cm. A column can be used.

[0015] As a bulking agent, they are dioxin and PCB. Since the interfering substance which lives together in the extract which was extracted and was obtained out of the sample in order to measure difficulty resolvability compounds, such as a kind, is removed, the bulking agent for clean-up can be used. For example, dioxin and PCB As a multilayer column for kind measurement “\*\* and a dioxin measurement manual (resource environmental cure separate volume volume [ 34th ] No. 13)” or “PCB processing technical guidebook (edit foundation Japan Industrial Waste Management Foundation --) Issue As indicated by Gyosei” From a column outlet side to SHIRIGAGERU 2% potassium-hydroxide covering silica gel, silica gel, 44% sulfuric-acid covering silica gel, The alumina column which carried out the laminating of the multilayer silica gel column and alumina which carried out the laminating of 22% sulfuric-acid covering silica gel, silica gel, 10% silver-nitrate covering silica gel, and the sodium sulfate, and the sodium sulfate, The activated carbon column which carried out the laminating of activated carbon burying silica gel and the sodium sulfate, the silica gel column which carried out the laminating of silica gel and the sodium sulfate are raised.

[0016] As the quality of the material of the filter used for this multilayer bulking agent packed column, a quartz fiber filter and a glass fiber filter are raised. the pore size which there is [ size ] no adsorption of dioxin, and it has [ size ] preferably the elasticity which produces moderate frictional force between a filter and a column outer case, and does not pass a bulking agent especially -- having -- \*\*\*\* -- thickness 0.1 mm from -- 1.5 mm -- desirable -- 0.2 mm from -- 1.0 mm It is a quartz fiber filter. The filter made from plastics, such as nylon and a nitrocellulose, is dioxin and PCB. It is not desirable in order to adsorb measuring object matter, such as a kind.

[0017] As a configuration of a filter, it is the same configuration as the configuration of the cross section of a column, and in order to strengthen frictional force between a filter and a column outer case and to stick it, a slightly larger thing than the cross section of a column is desirable. For example, a cross section is a bore. 9.5 mm With a circular column, it is bore 10 mm. A circular filter is desirable and a cross section is bore 15 mm. With a circular column, it is bore 16 mm. A circular filter is desirable. As for a filter, it is indispensable to insert in the outlet of a column and the topmost part of a bulking agent, and it can insert it between bulking agents different if needed. By putting in a filter between bulking agents, mixing of a bulking agent can be prevented and denaturation by contact of a bulking agent can be prevented. The insertion number of sheets of a filter can be fluctuated in order to adjust the rate of flow of the liquid which passes a column. Since pressure loss becomes small so that the size of a column is thick and there are few amounts of a bulking agent, the rate of flow becomes early. In this case, the number of sheets of a filter is made to increase. On the contrary, since pressure loss becomes large so that the size of a column is thin and there are many amounts of a bulking agent, the rate of flow becomes slow. In this case, the number of sheets of a filter is decreased. The filter for adjusting the rate of flow can be inserted between the outlet of a column, the topmost part of a bulking agent, or a bulking agent. It is the desirable bulking agent topmost part with easy insertion.

[0018] This column can be put in with desiccants and deoxidants, such as silica gel, into the sealed container or a bag after manufacture, and can raise shelf life. The cross section was shown in drawing 1 about the example of the multilayer silica gel column in the desirable mode according to this invention. Moreover, the cross section was shown in drawing 2 about the example of the alumina column in the desirable mode according to this invention. the desirable voice of this this invention -- according to the multilayer bulking agent packed column which can be set like, since a multilayer bulking agent packed column can be produced in large quantities and can be prepared beforehand, the production time amount of the column for processing of clean-up etc. can be saved, and the time amount needed for measurement through all processes can be reduced sharply. Moreover, since there are no turbulence and leakage of a packed bed even if it moves a column, it can be used, making it able to move to the location which cannot perform production of a column. Furthermore, by adjusting the number of sheets of the filter inserted in a column, the rate of flow of the liquid dipped in a column can be adjusted, the equipment for adjusting a cock's etc. rate of flow to a column outlet [ as / in the conventional column ] becomes unnecessary, and a column can be produced cheaply. Moreover, when pouring sample liquid etc. in a column, since the filter

**THIS PAGE BLANK (USP 10)**

exists, there are also few possibilities of disturbing the first bulking agent layer etc., and more smooth and good clean-up processing can also be expected from the ability also of the rate of flow to be adjusted further. Since it became possible to pack a bulking agent in the shape of a layer beforehand by preventing migration of a bulking agent layer substantially or it has arranged the above-mentioned filter and held the bulking agent layer in the column The column which can automate the process which carries out the laminating of this bulking agent to the column one by one, and has uniform and predetermined engine performance and quality (conventionally) It carries out. the place of analysis measurement -- business -- the time -- preparation -- it was -- since -- a bulking agent -- a multilayer -- being filled up -- a person -- there was also a side face of being dependent on skill -- moreover -- since it is necessary to carry out the laminating of each bulking agent carefully -- time amount and time and effort -- starting -- \*\*\*\* -- it can manufacture cheaply in large quantities, attaining laborsaving. Therefore, it is possible to also raise the dependability of the data which can respond also to a lot of samples, become possible [ performing analysis measurement by low cost ], and are obtained. Although the used bulking agent had the problem about the reuse and abandonment conventionally since it might be polluted with dioxin By adopting the system of using a disposable type multilayer bulking agent packed column according to this invention Without being able to carry out analysis measurement and a used column taking out the contents in each laboratory etc., avoiding contamination of a laboratory etc. if possible For example, since it becomes possible to reproduce or abandonment process collectively after bringing together in a concentration garbage dump etc., it is advantageous also in respect of safety.

[0019] "Immunoassay" has pointed out the technique of performing measurement which includes detection for analysis (ANARAITO), quality, and a quantum based on the measurement principle using an antigen-antibody reaction, detection, etc., among this specification. Co-PCB The technique which measures the included dioxin immunologically For example Kennel et al. and Chemosphere, 15 (9-12) : pp.2007-2010 (1986); Kennel et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 82 : pp.256-263 (1986); \*\*\*\*\* No. 4,798,807 (USP No.4,798,807); JP,63-14691,A; -- \*\*\*\*\* No. 5,429,925 (USP No.5,429,925); -- \*\*\*\*\* No. 5,464,746 (USP No.5,464,746); -- \*\*\*\*\* No. 5,538,852 (USP No.5,538,852); Watkins et al., Chemosphere, 19 (1-6) : pp.267-270; (1989) Stanker et al. and Chemosphere, 16 (8/9) : pp.1635-1639 (1987); Stanker et al., Toxicology, 45 : pp.229-243 (1987); Kennel et al., Chemosphere and 15(9-12): pp.2007-2010; (1986) The same approach and the changing method are substantially mentioned to \*\*\*\*\* etc. with the approach given in reference or them which were quoted the approach of a publication, or there. No. 5,674,697 (the publication in them by referring to it) (USP No.5,674,697) It includes in the indication of this specification. Especially a monoclonal antibody given in the above-mentioned reference, the approach given in reference quoted an approach given in this reference or there or they, and the monoclonal antibody substantially obtained by the same approach or the changing method can use it suitably. What used the monoclonal antibody which has high singularity to 2, 3, 7, and 8-TCDD is mentioned especially preferably.

[0020] Although an indicator is suitably used in immunoassay, it is the time amount decomposition fluorescence measuring-the strength of the light method (time resolved fluorescent spectroscopy) at this invention. The indicator according to a principle can be used suitably. The measuring method according to the principle of the time amount decomposition fluorescence measuring-the strength of the light method For example \*\*\*\*\* No. 4,058,732 (USP No.4,058,732); -- JP,62-18868,B; \*\*\*\*\* No. 4,374,120 (USP No.4,374,120); -- JP,57-186170,A; JP,58-8783,A number official report; JP,59-68673,A; JP,61-87680,A; JP,61-200988,A number official report; JP,64-47952,A; \*\*\*\*\* 64-500458 Number official report; JP,1-127957,A Official report; \*\*\*\*\* No. 4,374,120 (USP No.4,374,120) It is indicated by the reference quoted a publication or there. etc. -- They are applicable and also the same approach and the changing method are substantially mentioned with them (the publication in them is included in the indication of this specification by referring to it). . the time amount decomposition fluorescence measuring-the strength of the light method -- rare earth elements -- a lanthanide mentions more preferably -- having -- for example, -- Eu (III), Tb, etc. can use the strong fluorescence of the chelate to form (III).

[0021] In the concrete mode of immunological measurement according to this invention, it is the \*\* 1st reaction:anti-mouse IgG. Plastics well which combined the antibody (A) Dioxin content sample (sample) (B) and anti-dioxin monoclonal antibody (C) is put in and made to react. Then, [plastics well joint anti-mouse IgG The immune complex of antibody-anti-dioxin monoclonal antibody-dioxin] is formed.

\*\* The 2nd reaction : it is yaw ROPIUMU (Eu) indicator dioxin (D) to this immune complex. If it is made to react, an unreacted anti-dioxin monoclonal antibody and Eu indicator dioxin react, and it is the [plastics well joint anti-mouse IgG. The immune complex of antibody-anti-dioxin monoclonal antibody-Eu indicator dioxin] is formed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



\*\* The 3rd reaction : enhancer (E) In addition, the amount of Eu in an immune complex is measured with a time amount decomposition fluorometry machine, and the amount of dioxin in a sample is read in the calibration curve beforehand created based on the acquired value. As a reagent suitable for this immunological measurement, high BURIZAIMU and the thing which can come to hand from the U.S. are mentioned, for example. The dioxin and/or PCB by which especially the toxicity, such as 2, 3, 7, and 8-TCDD, etc. is made the problem, for example if this invention is followed The data for evaluation of a kind can be obtained by quick and easy technique in a short time. Moreover, there is an advantage that it can respond also to analysis measurement processing of many samples. It is the analysis and evaluation of the data (to acquisition of the data related to the toxicity etc., such as obtaining TEQ especially) further, without needing expensive measuring equipment in immunoassay at the measurement itself. GC-MS Exceptional skill is not necessarily required like and the advantage that the versatility that anyone can treat almost is high is also accepted. Moreover, what was known by this contractor may be made to suit this dioxin measurement as an immunological measuring device. Such equipment is CPU. And you may have the computer which carried memory, and according to the program decided beforehand, such equipment can be set up so that optimal measurement can be performed. Moreover, although what carried out program control of the necessary processing to the automation list can use it preferably, especially if it is also possible to change a Measuring condition for each sample of every, and an advantageous advantage is acquired according to this invention, this equipment will not be limited while the actuation is automatable. The first process which extracts dioxin and/or PCBs from a sample (sample) using a solvent in this invention, The second process which separates the matter, the dioxin, and/or PCBs which are contained in an extract, It is in the measuring method of the dioxin it is incomparable from a series of processes including the third process which carries out the analysis quantum of the dioxin and/or PCBs which were separated, and/or PCBs. The advantage according to rank with quick realizable measurement simple also as the whole is acquired by adopting each means which has an advantage, respectively and applying as a system which made it one. The result (result with high functionality) which is not different from a conventional method (the regulating method), or is equal to it can be obtained using immunoassay.

[0022]

[Example] Although an example is hung up over below and this invention is explained concretely, this example is only offered for reference of that concrete mode for explanation of this invention. Although these instantiation is for explaining the specific concrete mode of this invention, the range of invention indicated by this application is not limited, or it does not mean restricting. In this invention, it should be understood that various operation gestalten based on the thought of this specification are possible. It can carry out and this is [ being / which was carried out using the standard technique except what otherwise indicates all examples in a detail / a thing, or ] idiomatic for this contractor at common knowledge.

[0023] Example 1 Measurement of the dioxin in a smoke dust, and examination 1 of recovery Extract smoke dust of dioxin (smoke dust A) 2 g ASE200 \*\* (product made from die ONEKUSU) It puts into 11 mL cel. The manual used of ASE200 is followed and it is an extracting solvent. It extracted by the extraction condition of a two cycle for 150 \*\*, 2000 psi, and 15 minutes using 5 % acetic-acid content toluene. It was obtained by extract. The extract of 24 mL is dried using a centrifugal mold evaporator. Hexane after removing 5 % acetic-acid content toluene 10mL The residue was dissolved and Extract A was obtained. To this actuation, it is 100. Between parts was required. Moreover, it is 5 ng/mL to smoke-dust A 2 g. Similarly, it extracts and evaporates, the hexane dissolution of the smoke dust B which hexane solution 0.5 mL containing 2, 3, 7, and 8-dibenzo tetrachloride-Para-dioxin was added [ smoke dust ], and evaporated the hexane is carried out, and it is 10 mL. Extract B was obtained.

[0024] 2) It is diameter 16 mm to the cylindrical glass column of bore 15 mm which equipped the preparation outlet of a multilayer silica gel column with the cylindrical glass tube of bore 4 mm and die-length 1 cm, and die-length 10 cm. Thickness fabricated in the circle configuration The quartz fiber filter (Watt Mann make) of 0.45 mm was put in so that the deep pool of a filter might contact a column outer wall. this column -- silica gel 0.09 -- g, 2 % potassium-hydroxide covering silica gel 0.3 g, silica gel 0.09g, 44 % sulfuric-acid covering silica gel 0.45 g, 22 % sulfuric-acid covering silica gel 0.60g, silica gel 0.09g, 10 % silver-nitrate covering silica gel 0.3 g, and sodium-sulfate 0.6 g the sequence from an outlet side -- a laminating -- carrying out -- diameter 16 mm The circle configuration quartz fiber filter was put on the sodium sulfate. This column was produced beforehand and saved in the desiccator.

[0025] 3) It is diameter 10.0 mm to the cylindrical glass column of bore 9.6 mm which equipped the preparation outlet of an alumina column with the cylindrical glass tube of bore 2 mm and die-length 1 cm, and die-length 15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cm. Thickness 0.45 mm fabricated in the circle configuration The quartz fiber filter (Watt Mann make) was put in so that the deep pool of a filter might contact a column outer wall. An alumina (activity 1) is made this column, the laminating of 2.5 g and the sodium-sulfate 1.0 g is made to sequence from an outlet side, and it is diameter 10 mm. The circle configuration quartz fiber filter was put on the sodium sulfate. This column was produced beforehand and saved in the desiccator.

[0026] 4) It is a hexane to the clean-up multilayer silica gel column of a sample. The sink and the column were washed for 20 mL. Subsequently, Extract A is charged and an eluate is extracted. Subsequently, hexane 50 mL It used and washed, the eluate was extracted and it mixed with the previous eluate. For 90 minutes was required for this actuation. Next, it is hexane 10 mL about an alumina column. The sink and the column were washed. Next, whole-quantity charge of the obtained eluate is carried out, and, subsequently they are hexane 10 mL and 2 % dichloromethane content hexane 20 mL. It washes. Subsequently, 50 % dichloromethane content hexane 20 mL The column was washed and the eluate was extracted. Methanol after drying this eluate using a centrifugal mold evaporator and removing 50 % dichloromethane content hexane The residue was dissolved in 0.2 mL and the specimen A for measurement was obtained. It is 120 to this actuation. Between parts was required. Same actuation was performed also about Extract B and the specimen B for measurement was obtained.

[0027] 5) Use the dioxin immunoassay kit (product made from high BURIZAIMU) based on the principle of the immunity measuring-time decomposition fluoroimmunoassay of a specimen. 0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, The 2, 3, 7, and 8-dibenzo tetrachloride-Para-dioxin standard solution and the measurement specimen A of each concentration of 40 ng/mL, and the measurement specimen B were measured, and the concentration of the measurement specimen A and the measurement specimen B was read using the calibration curve created from the criterion. The amount of dioxin and recovery in a smoke dust were calculated from the obtained concentration, and it was shown in Table 1. 86 % and high recovery were acquired by this method. For 40 minutes is required for this actuation, and it is a total 350 because of measurement of dioxin. The part was required.

[0028]

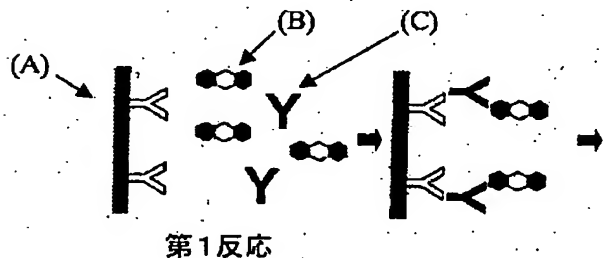
[Table 1]

項 目	
ばいじんA (2 g中) ダイオキシン量	1. 20 ng
ばいじんB (2 g中) ダイオキシン量	3. 34 ng
2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾ-パラ-ダイオキシン添加量	2. 50 ng
回収率	86%

[0029] : whose measurement principle of the above-mentioned dioxin immunoassay kit is as follows -- the 1st reaction: Plastics well (A) which combined the anti-mouse Ig G antibody Dioxin content sample (B) Anti-dioxin monoclonal antibody (C) if it is made to put in and react -- [plastics well -- the immune complex of joint anti-mouse IgG antibody-anti-dioxin monoclonal antibody-dioxin] is formed.

[0030]

[Formula 1]

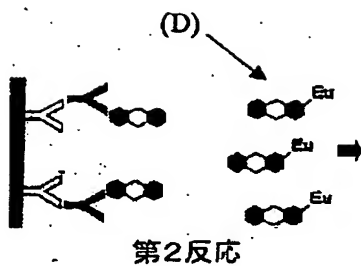


[0031] the 2nd reaction: this generation complex -- yaw ROPIUMU (Eu) indicator dioxin (D) if it is made to react -- an unreacted anti-dioxin monoclonal antibody and Eu indicator dioxin -- reacting -- [plastics well association -- anti- -- the immune complex of mouse IgG antibody-anti-dioxin monoclonal antibody-Eu indicator dioxin] generates.

[0032]

[Formula 2]

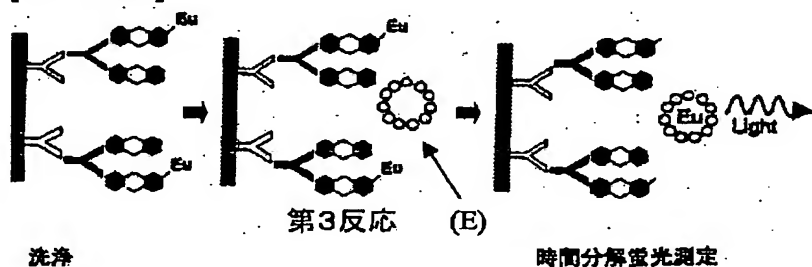
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



[0033] The 3rd reaction: Enhancer (E) In addition, the amount of Eu in an immune complex is measured with a time amount decomposition fluorometry vessel. The amount of dioxin in a sample is read in the calibration curve created beforehand.

[0034]

[Formula 3]



When inquired based on the above result, the time amount which a measuring object sample is extracted, and measurement of content dioxin and/or PCBs is requested the back, performs the measurement, and is required by the join lucky notice was estimated that it can aim at period compaction sharply with about one week by the conventional method (the regulating method) with the gaging system of this invention to requiring about one-month and half extent.

[0035] Example 2 The result of having measured dioxin concentration by the approach of functionality this invention was compared with the result measured by the approach according to the "assay approach of special managed domestic-wastes and criteria which start managed industrial waste specially" (number [ of July, Heisei 4 Notice of the Ministry of Health and Welfare / 192nd ] amendment: Taira 12 welfare notice No. 6) attached table 1st.

1) The smoke dust of three specimens was measured by the approach according to the measurement "assay approach of special managed domestic-wastes and criteria which start managed industrial waste specially" attached table 1st in the conventional measuring method. The concentration of dioxin is TEQ which multiplied by it and computed the toxic multiplier of each dioxin. It expressed.

2) By the same approach as the measurement example 1 in this invention method, the amount of dioxin contained in the smoke dust (smoke-dust C:0.99 g, smoke-dust D:2.0 g, smoke-dust E:3.83 g) of three specimens was measured. The cel used for the extract of ASE200 responds to the amount of a specimen, and is 11 mL. Or 22 mL It changed and used for the cel. Functionality was shown for the result in Table 2 at drawing 3 .

Consequently, a correlation coefficient 0.99 and high functionality were acquired.

[0036]

[Table 2]

サンプル名	従来の方法	本発明の方法
	(ng-TEQ/g)	(ng/g)
ばいじんC	25	5.25
ばいじんD	2.55	0.60
ばいじんE	0.96	0.22

According to the immunoassay of this invention, dioxin with many target problems can be quickly measured per many specimens by easy actuation.

[0037]

[Effect of the Invention] By this invention, quick measurement of dioxin and/or PCBs is attained for various samples for easy and a short time. Moreover, although it contributes also to laborsaving greatly possible

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[ comparing a lot of specimens with the former, and treating very much from quick measurement being possible, for a short time ], the measurement result about large dioxin in question can be obtained with dependability to toxicity etc. by one side. A satisfying result can be obtained without obtaining what the value acquired can fully satisfy, and making an issue of a measurement implementation person's level of skill so much also in the measurement actuation further, even if it combines with simple clean-up processing to measuring object dioxin especially by immunological measurement, since specific measurement is possible. By this invention, measurement of dioxin and/or PCBs can carry out by low cost. Since the used column which could wash the bulking agent currently polluted with this invention by using the multilayer bulking agent packed column which packed simple clean-up processing beforehand whenever the measurement implementation person was measurement, could exclude the actuation which is complicated and requires cautions packed in a column, and was discarded can also give to playback and/or abandonment processing collectively, it is large also in respect of safety to a low-cost-ized list in the place which contributes. Moreover, the clean-up effect which eliminated the variation and was stabilized also about the effectiveness of chromatography processing can be expected. Especially this invention of perform [ it / except having indicated in the above-mentioned explanation and the example ] is clear. In view of above-mentioned instruction, many alterations and deformation of this invention are possible, therefore they are also the things of the claim of this attachment within the limits.

---

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (C-11)



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-330609  
(P2001-330609A)

(43) 公開日 平成13年11月30日 (2001. 11. 30)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 4 D 0 1 7
B 0 1 D 11/02		B 0 1 D 11/02	A 4 D 0 5 6
15/08		15/08	
// G 0 1 N 33/577		G 0 1 N 33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2000-150181(P2000-150181)

(22) 出願日 平成12年5月22日 (2000. 5. 22)

(71) 出願人 390010205

富士薬品工業株式会社

富山県高岡市長慶寺530番地

(72) 発明者 坂田 一登

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(72) 発明者 藤本 昇

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(74) 代理人 100097582

弁理士 水野 昭宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイオキシン測定方法

(57) 【要約】

【課題】 排ガス、排水、焼却灰、土壌、生物、食品などのダイオキシン類の濃度を簡易・迅速に且つ低コストで大量に測定する手段の開発。

【解決手段】 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法に付し、次いで得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、得られた試料につき免疫学的測定法によりダイオキシン類を測定することで、ダイオキシン類の濃度を簡易・迅速に且つ低コストで大量に測定することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法に付し、次いで得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、得られた試料につき免疫学的測定法によりダイオキシン類を測定することを特徴とするダイオキシンの測定方法。

【請求項2】 簡易クリーンアップ処理は、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びアルミナカラムクロマトグラフィーを用いることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】 アルミナカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項5】 多層充填剤充填カラムが、充填剤層をサンドイッチする形式で且つ該充填剤層の移動を実質的に防止あるいは該カラムに実質的に固定する形式でフィルターが配置されているものであることを特徴とする請求項3又は4記載の方法。

【請求項6】 該フィルターが石英繊維フィルター及び／又はガラス繊維フィルターであることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項7】 多層充填剤充填カラムは、ディスポーザブル式のものであることを特徴とする請求項3～6のいずれか一記載の方法。

【請求項8】 (A) 分析対象試料からダイオキシン類成分を抽出するための高速溶媒抽出装置、(B) 該抽出装置により得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理するための多層シリカゲルカラム及びアルミナカラム及び(C) 該簡易クリーンアップ処理された試料を免疫学的測定するための装置を備えることを特徴とするダイオキシン測定装置。

【請求項9】 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法で抽出し、得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、次に得られた試料を免疫学的測定法で測定することを特徴とするダイオキシンの測定システム。

【請求項10】 簡易クリーンアップ処理に、予めバックされている多層充填剤充填カラムを使用することを特徴とする請求項9記載のシステム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、排煙、排ガス、排水、焼却灰、廃棄物、土壌、食品、動植物等の中のダイオキシン類及び／又はポリ塩化ビフェニル類（PCB類）の濃度を簡易・迅速に測定することができ、さらに安価に且つその操作も簡便で、そして正確で且つ信頼できる定量をも可能にする分析測定法、そのための装置及

び該測定システムに関する。

## 【0002】

【従来の技術】ダイオキシン類は環境汚染物質としてその正確な分析測定、そして定量が大きな課題となっている。ダイオキシン類は農業等に混入していた汚染物質であるだけでなく、ゴミの焼却にともなって排煙中に含まれたり、焼却灰など、さらには様々な廃棄物中に存在して水や大気や土壌を汚染していることが大きな課題となっている。ダイオキシン類は、環境ホルモンとして人体だけでなく、広く動植物に有害な作用を与え、自然環境をも破壊するものとして深刻な社会問題化した化合物である。したがって、ダイオキシン類の存在形態は様々であるが、微量に存在するだけでも毒性が強いなど大きな問題を生ずることから、正確で且つ信頼できるダイオキシン類の定量が必要とされている。ダイオキシン類と一般に言われているが、日本で規制の対象となっているダイオキシン類とは、ポリ塩化ジベンゾダイオキシン（PCDD）とポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）の一部の異性体である。PCDDでは異性体が75、PCDFでは135の異性体がある。また欧米では、209の異性体をもつポリ塩化ビフェニル（PCB）の一部の中でも毒性の強い12種類についてはコプラナPCB（Co-PCB）と呼んで、ダイオキシン類に含めている。普通、ダイオキシン類の濃度を表すには、最も毒性の強い2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（2,3,7,8-TCDD）の毒性に換算した等価毒性濃度（TEQ）で示される。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】ダイオキシン類及び／又はPCB類の測定・分析は、基本的には超微量の分離定量分析であるにもかかわらず、厳密な精度管理が要求される。また分析時間の短縮、自動化、コストダウンも重要な課題である。ダイオキシン類及び／又はPCB類の測定・分析には、主に試料（サンプル）から溶剤を用いてダイオキシン類及び／又はPCB類を抽出する第一工程、抽出液中に含まれる物質とダイオキシン類及び／又はPCB類を分離する第二工程、そして分離したダイオキシン類及び／又はPCB類を分析定量する第三工程からなる。この中で、試料の前処理としてのダイオキシン類及び／又はPCB類の抽出（第一工程）では、多量の溶媒等の試薬類を使用するだけでなく、抽出時間も固体試料で一般的なソックスレー抽出の場合、16時間以上をも要する。普通この16時間以上を要する抽出は、2日に分けて行われ、溶媒を除去する処理と併せると大変な長時間を要することになる。ダイオキシン類は、上記したようにその試料の形態は様々であるにもかかわらず、超微量の分離分析操作であることから、器壁への付着を避ける工夫や、廃液や抽出処理に使用した溶媒からも幾度となく回収処理をしなければならないというように大変煩雑な操作を必要とする。さらに、排ガス、排水、土壌、焼却灰などの中のダイオキシン類を分析し

て、その濃度を示そうとすれば、問題となるダイオキシン類の異性体のそれぞれを測定して積算しなければならない。第三工程では、普通ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を使用するが、ダイオキシン類を異性体ごとに分析するために、そのGC-MS は高分解能のものを使用してしかその測定ができない。ダイオキシン類を分析することのできる高分解能GC-MS は非常に高価で、日本国内では約100 台程度普及しているだけであるのが現状である。また、そのGC-MS を使用しての測定も特定の技能をもつ者によらなければ解析して結果を出せないという問題もある。

【0004】

【課題を解決するための手段】様々な試料を対象として、それらの中に含まれる可能性のあるダイオキシン類及び／又はPCB類の極めて微量を、迅速且つ低コストで、信頼性のある結果を与える方法につき鋭意研究を進めた結果、試料（サンプル）から溶剤を用いてダイオキシン類及び／又はPCB類を抽出し（第一工程）、抽出液中に含まれる物質とダイオキシン類及び／又はPCB類を分離し（第二工程）、分離したダイオキシン類及び／又はPCB類を分析定量する（第三工程）からなるダイオキシン類及び／又はPCB類の測定法において、第一工程として高速溶媒抽出法、第二工程として簡易クリーンアップ処理、そして第三工程として免疫学的測定法を採用することにより、優れた利点が得られることを見出して、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、

〔1〕 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法に付し、次いで得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、得られた試料につき免疫学的測定法によりダイオキシン類を測定することを特徴とするダイオキシンの測定方法；

〔2〕 簡易クリーンアップ処理は、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びアルミナカラムクロマトグラフィーを用いることを特徴とする上記〔1〕記載の方法；

〔3〕 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする上記〔2〕記載の方法；

〔4〕 アルミナカラムクロマトグラフィーは、多層充填剤充填カラムを使用して行われるものであることを特徴とする上記〔2〕記載の方法；

〔5〕 多層充填剤充填カラムが、充填剤層をサンドイッチする形式で且つ該充填剤層の移動を実質的に防止あるいは該カラムに実質的に固定する形式でフィルターが配置されているものであることを特徴とする上記〔3〕又は〔4〕記載の方法；

【0006】〔6〕 該フィルターが石英繊維フィルター及び／又はガラス繊維フィルターであることを特徴とする上記〔5〕記載の方法；

〔7〕 多層充填剤充填カラムは、ディスポーザブル式のものであることを特徴とする上記〔3〕～〔6〕のいずれか一記載の方法；

〔8〕 (A) 分析対象試料からダイオキシン類成分を抽出するための高速溶媒抽出装置、(B) 該抽出装置により得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理するための多層シリカゲルカラム及びアルミナカラム及び(C) 該簡易クリーンアップ処理された試料を免疫学的測定するための装置を備えることを特徴とするダイオキシン測定装置；

〔9〕 分析対象試料からダイオキシン類成分を高速溶媒抽出法で抽出し、得られた抽出物を簡易クリーンアップ処理し、次に得られた試料を免疫学的測定法で測定することを特徴とするダイオキシンの測定システム；及び

〔10〕 簡易クリーンアップ処理に、予めバックされている多層充填剤充填カラムを使用することを特徴とする上記〔9〕記載のシステムを提供するものである。

【0007】本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【0008】

【発明の実施の形態】本明細書中、「高速溶媒抽出法」とは、一般的に高速溶媒抽出 (Accelerated Solvent Extraction; ASE) と呼ばれる方法により、セルに充填した試料から、有機溶媒をその沸点以上の高温（例えば、50～200℃）／高圧（例えば、1500～2000 psi = おおよそ 105～141 kgf/cm<sup>2</sup>、但し 1 psi = おおよそ 0.070307 kgf/cm<sup>2</sup>）の条件下にて迅速に抽出する方法である。該ASE 技術については、米国特許明細書第 5,843,311号 (USP No. 5,843,311)、国際公開第95/34360号明細書 (W 095/34360)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。さらにASEに適した装置は、米国特許明細書第 5,785,856号 (USP No. 5,785,856)、米国特許明細書第 5,647,976号 (USP No. 5,647,976) に開示がある（これらの文献などに記載の装置やその使用方法あるいはそこで引用された文献記載の装置や方法あるいはそれらと実質的に同様な装置や方法（改変された装置や方法を含む）

は当業者であれば適宜選択使用することもできる（該文献の中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

【0009】本発明にしたがい、Co-PCBを含めたダイオキシン類を試料からASE法で抽出するには、以下のような条件で行うことが好ましい。まず、抽出温度は、使用する抽出有機溶媒にもよるが、通常、使用溶媒の沸点以上の高温、例えば、80～250℃で、より好ましくは100～200℃であってよい。代表的な例では、トルエン又は5%酢酸含有トルエンを抽出溶媒として使用した場合は、150～200℃で好ましく抽出操作でき、アセトン

を抽出溶媒として使用した場合は、150℃で好ましく抽出操作できる。所望成分の分解を避ける必要がある場合は、適宜低い温度を選択する。抽出時の圧力としては、使用する抽出有機溶媒にもよるが、通常、80～250 kgf/cm<sup>2</sup>で、例えば、100～200 kgf/cm<sup>2</sup>が好ましく使用でき、代表的な抽出圧力としては、130～150 kgf/cm<sup>2</sup>が好ましい。抽出溶媒としては、例えば、Co-PCBを含めたダイオキシン類は脂溶性であるので、有機溶媒を使用するのが好ましい。代表的な抽出溶媒としては、例えば、トルエン、ベンゼン、アセトン、あるいは酢酸などの混和性を持つ有機溶媒をそれらに混合した溶媒が挙げられるが、これらに限定されることなく、本発明において有利な性状のものを適宜選択して使用できる。また、抽出溶媒は、後の免疫学的測定法によるダイオキシン類の測定には、水性媒体中で試料を扱えるようにすることも必要であり、これに適した溶媒に転換する処理が必要とされるので、これに適した溶媒を選択する。一つの試料に対しての抽出処理は、繰り返し行うことも可能であり、例えば1又は複数のサイクルを適用できる。好適には、2又は3サイクルの抽出処理を施すが、適宜そのサイクル数は増減できる。

【0010】ASE法は、個々の試料に応じてその最適な抽出条件、例えば、溶媒の種類、抽出温度、抽出時間、抽出圧力、抽出サイクルなどを、予め実験などを行って決定しておくことができる。ASEを実行する装置は、CPU及びメモリーを搭載したコンピューターを備えたものであってよく、そうした装置は予め決められたプログラムに従い、最適な抽出を行うことができるように設定できる。また該装置は、その操作を自動化できると共に、個々の試料毎に抽出条件を変えることも可能であり、例えば24時間のフル操業を可能にする。こうした装置を使用することにより、時間の短縮、大量処理、操作の簡素化、低コスト化、省力化を大幅に図ることが可能となる。高速溶媒抽出装置は、ダイオネクス社（Dionex Corporation, CA, USA）から入手することができ、所要の処理を自動化並びにプログラム制御したものが好ましく使用できるが、本発明にしたがい有利な利点を得られるならば特に限定されることはない。土壌や生物体由来試料などで水分が存在する場合には、水分除去をしておいた

り、水溶性溶媒で処理した後抽出するとかの工夫を加えることも任意に採用できる。また、抽出溶媒を選択して任意に特定の成分を選択的に抽出してもよい。また試料の内部からもダイオキシン類などを抽出する必要がある場合には、事前に塩酸などで処理することも可能である。

【0011】ダイオキシン類及び／又はPCB類の測定・分析は、基本的には超微量の分離定量分析で、厳密な精度管理が要求される一方、分析時間の短縮、自動化、コストダウンも重要な課題である。この中で、試料の前処理としてのダイオキシン類及び／又はPCB類の抽出では、多量の溶媒等の試薬類を使用するだけでなく、抽出時間も固体試料で一般的なソックスレー抽出の場合、16時間以上を要するものである。普通この16時間以上を要する抽出は、2日に分けて行われる。これに対し、上記高速溶媒抽出法によれば、例えば30分～2時間程度、もっとも長時間を要したとしてもせいぜい4時間程度までで完了させることができる。つまり、本発明で抽出に2時間程度要したとしても、抽出時間は約1/8程度に大幅に短縮することができる。

【0012】一般に環境試料には多種多様の有機化合物などの有機物質が存在する上、ダイオキシン類及び／又はPCB類の存在量はppb～ppqのオーダーという極微量であるため、確実な測定を行うためには、ダイオキシン類及び／又はPCB類の損失を極力抑えながら、できる限りダイオキシン類などの分析に妨害あるいは影響を与える化合物などを除去する必要がある。このためにもクリーンアップ操作は非常に重要である。被検試料中には数多くの有機物が存在しており、ダイオキシン類などの分析を妨害する化合物も少なくない。特に芳香族成分の存在量は、ダイオキシン類と比較して圧倒的に高濃度であり、分析への影響は大きい。そこで、そうした妨害成分などを除く目的で硫酸による処理を加えていたが、それに代わるものとして、その作業効率を上げ、さらに作業の安全性などを配慮したものとして、また、焼却灰や一部の汚泥その他には単体の硫黄などが含まれている場合があり、この硫黄を除去しないまま分析を行うと、所定のダイオキシン成分の分析を大きく妨害することからこれを排除するため、硝酸銀による処理も同時に可能なものとして、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる処理がなされる。該多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーでは、普通、試料液に含まれる強極性物質の除去を目的としたシリカゲルカラム処理が同時になされる工夫もなされている。

【0013】該多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー処理された試料は、次にアルミナカラムクロマトグラフィー処理される。こうした抽出液中に共存する妨害物質を除去するの目的には、例えば「続・ダイオキシン類測定マニュアル（資源環境対策 別冊 第34巻第13号）」に記載のシリカゲルカラム、多層シリカゲルカラ

ム又はアルミナカラム等を組み合わせて共存する妨害物質を充填剤に吸着させて除去する方法、「PCB 処理技術ガイドブック（編集 財団法人 産業廃棄物処理事業振興財団、発行 ぎょうせい）」のシリカゲルカラム、多層シリカゲルカラム、アルミナカラム、フロジリルカラム、活性炭カラム等を組み合わせて用いて共存する妨害物質を充填剤に吸着させて除去する方法などが挙げられる。ところで、上記の方法では、カラム材質にガラスを使用し、充填剤の流出を防ぐためにカラム出口に石英ウールを使用したりしているが、石英繊維フィルターやガラス繊維フィルターは使用されておらず、かつ充填剤の境界部分又は最上部に充填剤の移動や混合を防止するための石英ウールやフィルターは使用されていない。また、流速を調節するためにカラム出口にコックを備えたカラムを使用し、流速を2.5 mL/分に調節している。しかしながら、こうした従来のダイオキシン類やPCB 類等をクリーンアップするためのカラムは、充填剤の移動防止のための措置が講じられていないため、充填後にカラムを横向きにしたり転倒すると充填剤が漏れたり、混合したりする。この充填剤の移動防止のための措置が講じられていないのは、フィルターや石英ウールをカラムに固着するために接着剤やプラスチック押さえ等を用いるとダイオキシン類やPCB 類がそれに吸着し、正確な測定ができなくなるためである。このため、通常カラムは使用前に充填剤を充填し、充填した場所から別の場所へ移動することができないため、サンプル採取場所等のカラム充填ができない場所での使用ができない。

【0014】本発明に従った好ましい態様では、充填剤層をサンドイッチする形式で且つ該充填剤層の移動を実質的に防止あるいは該カラムに実質的に固定する形式でフィルターが配置されているカラムを使用する。つまり、カラムの外壁とフィルター淵との摩擦力によりフィルターをカラムに固定することにより充填剤をカラム内に保持することにより、充填剤の充填後でも移動可能なカラムが製造でき、かつ、挿入するフィルターの枚数を調節することにより流速が調節できる。該カラムは、2種以上の充填剤を層状に充填したオープンカラムにおいて、カラムの出口及び充填剤の境界部分及び／又は最上部にカラムの断面と同じ形状でかつカラム壁とのフィルター淵との摩擦力によりカラム内に固定できるフィルターを入れて充填剤の移動を防止することを特徴とする多層充填剤充填カラムである。該カラムは、オープンカラムを使用するが、オープンカラムの外筒の素材としては、ガラス、石英、ステンレス、フッ素樹脂を用いることができる。このうち好ましいものは、ダイオキシン類やPCB 類などの吸着がほとんどないガラスである。オープンカラムの断面形状としては、円形、楕円形、四角形、三角形など用途に応じて任意のものをを用いることができる。このうち好ましいものは、加工し易い円形である。これらオープンカラムは、出口の径を細くすること

によりカラムを通過した溶液を採取し易くすることができる。オープンカラムの太さと長さは、充填する充填剤の量に応じて任意に設定することができる。充填剤の量が同じ場合、カラムの太さが太くなるほど通過する液体の圧力損失が小さくなり流速が早くなり、逆に細くすると圧力損失が大きくなり流速が遅くなる。また、充填剤の粒子径や密度によっても圧力損失が変化するため、カラムの太さは、最も適する流速となるように設定することができる。通常のクリーンアップカラムの充填剤の量では、内径5 mmから30 mmの円形断面のカラムで、長さが5 cmから30 cmのカラムを用いることができる。

【0015】充填剤としては、ダイオキシン類やPCB 類等の難分解性化合物を測定するために、サンプル中から抽出して得た抽出液中に共存する妨害物質を取り除くためクリーンアップ用充填剤を用いることができる。例えば、ダイオキシン類やPCB 類測定のための多層カラムとしては、「続・ダイオキシン類測定マニュアル（資源環境対策 別冊 第34巻第13号）」又は「PCB 処理技術ガイドブック（編集 財団法人 産業廃棄物処理事業振興財団、発行 ぎょうせい）」に記載されているように、カラム出口側からシリカゲル、2%水酸化カリウム被覆シリカゲル、シリカゲル、44%硫酸被覆シリカゲル、22%硫酸被覆シリカゲル、シリカゲル、10%硝酸銀被覆シリカゲル及び硫酸ナトリウムを積層した多層シリカゲルカラムやアルミナと硫酸ナトリウムを積層したアルミナカラム、活性炭埋蔵シリカゲルと硫酸ナトリウムを積層した活性炭カラム、シリカゲルと硫酸ナトリウムを積層したシリカゲルカラムなどがあげられる。

【0016】該多層充填剤充填カラムに使用するフィルターの材質としては、石英繊維フィルターとガラス繊維フィルターがあげられる。特に好ましくは、ダイオキシン類の吸着がなく、フィルターとカラム外筒との間に適度な摩擦力を生じさせる弾性を持ち、充填剤を通過させないポアサイズを持っており、厚さが0.1 mmから1.5 mm、好ましくは0.2 mmから1.0 mmの石英繊維フィルターである。ナイロン、ニトロセルロースなどのプラスチック製のフィルターは、ダイオキシン類やPCB 類などの測定対象物質を吸着するため好ましくない。

【0017】フィルターの形状としては、カラムの断面の形状と同じ形状であり、フィルターとカラム外筒との間の摩擦力を強くして密着させるため、カラムの断面よりわずかに大きいものが好ましい。例えば、断面が内径9.5 mmの円形カラムでは内径10 mmの円形フィルターが好ましく、断面が内径15 mmの円形カラムでは内径16 mmの円形フィルターが好ましい。フィルターはカラムの出口と充填剤の最上部に挿入することが必須であり、必要に応じて異なる充填剤の間に挿入することができる。充填剤の間にフィルターを入れることにより、充填剤の混合を防止でき、充填剤の接触による変性を防止することができる。フィルターの挿入枚数は、カラムを通

過する液体の流速を調節するために増減することができ、カラムの太さが太く、充填剤の量が少ないほど圧力損失が小さくなるため流速が早くなる。この場合、フィルターの枚数を増加させる。逆に、カラムの太さが細く、充填剤の量が多いほど圧力損失が大きくなるため流速が遅くなる。この場合、フィルターの枚数を減少させる。流速を調整するためのフィルターは、カラムの出口、充填剤の最上部又は充填剤の間に挿入することができる。好ましくは、挿入が簡単な充填剤最上部である。

【0018】該カラムは、製造後、密閉した容器又は袋の中にシリカゲルなどの吸湿剤や脱酸素剤と共に入れ、保存性を高めることができる。本発明に従った好ましい態様における多層シリカゲルカラムの例につき、その断面を図1に示した。また、本発明に従った好ましい態様におけるアルミナカラムの例につき、その断面を図2に示した。該本発明の好ましい態様における多層充填剤充填カラムによれば、あらかじめ多層充填剤充填カラムを大量に作製して用意しておくことができるため、クリーンアップなどの処理用のカラムの作製時間を省くことができ、全工程を通して測定に必要とされる時間を大幅に削減できる。また、カラムを移動させても充填層の乱れや漏れがないため、カラムの作製ができない場所へ移動させて使用することができる。更に、カラムへ挿入するフィルターの枚数を調節することによりカラムに通液する液体の流速が調節でき、従来のカラムにおけるようなカラム出口にコックなどの流速を調節するための装備が不要となり、安価にカラムを作製することができる。また、サンプル液などをカラムに流す場合、フィルターが存在しているので最初の充填剤層をかき乱すなどという恐れも少なく、さらに流速も調節できることから、よりスムーズで良好なクリーンアップ処理を期待することもできる。上記フィルターを配置してカラム内に充填剤層を保持しておくあるいは充填剤層の移動を実質的に防止することにより、予め充填剤を層状に詰めておくことが可能となったので、該充填剤をカラムに順次積層していく工程を自動化でき、均一で且つ所定の性能・品質を有するカラム（従来は、分析測定の場合で用時調製であったので、充填剤を多層に充填する者の技能に依存するという側面もあったし、また注意深く各充填剤を積層していく必要もあるので時間と手間がかかっていた）を、大量に且つ安価に、そして省力化を図りながら製造しておくことができる。したがって、大量のサンプルにも対応でき、低コストで分析測定を行うことが可能となるし、得られるデータの信頼性も高めることが可能である。使用済みの充填剤は、ダイオキシン類で汚染されている可能性があることから、従来その再使用や廃棄については問題を抱えていたが、本発明にしたがいディスポーザブル式多層充填剤充填カラムを使用するというシステムを採用することにより、可能な限り実験室などの汚染を避けながら分析測定を実施でき、また使用済みカラムはその

内容物をそれぞれの実験室などで取り出すことなく、例えば集中廃棄物処理場などに集めた後、まとめて再生あるいは廃棄処理することが可能となるので、安全性の面でも有利である。

【0019】本明細書中、「免疫学的測定法」とは、抗原抗体反応を利用した測定原理に基づいて分析対象（アナライト）の検知、定性及び定量を含めた測定、検出などを行う技術を指している。Co-PCBを含めたダイオキシン類を免疫学的に測定する技術は、例えば、Kennel et al., Chemosphere, 15(9-12): pp.2007-2010 (1986); Kennel et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 82: pp.256-263 (1986); 米国特許明細書第 4,798,807号 (USP No.4,798,807);特開昭63-14691号;米国特許明細書第 5,429,925号 (USP No.5,429,925);米国特許明細書第 5,464,746号 (USP No.5,464,746);米国特許明細書第 5,538,852号 (USP No.5,538,852);Watkins et al., Chemosphere, 19(1-6): pp.267-270 (1989); Stanker et al., Chemosphere, 16(8/9): pp.1635-1639 (1987); Stanker et al., Toxicology, 45: pp.229-243 (1987); Kennel et al., Chemosphere, 15(9-12): pp.2007-2010 (1986); 米国特許明細書第 5,674,697号 (USP No.5,674,697) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。特に上記文献に記載のモノクローナル抗体や、該文献に記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により得られるモノクローナル抗体は、好適にそれを使用することができる。特に好ましくは、2,3,7,8-TCDDに対して高い特異性を持つモノクローナル抗体を使用したものが挙げられる。

【0020】免疫学的測定法では、好適には標識が使用されるが、本発明では、時間分解蛍光測定法（time resolved fluorescent spectroscopy）の原理に従った標識が好適に利用されることができる。時間分解蛍光測定法の原理に従った測定法は、例えば、米国特許明細書第 4,058,732号 (USP No.4,058,732);特公昭62-18868号公報; 米国特許明細書第 4,374,120号 (USP No.4,374,120);特開昭57-186170号公報;特開昭58-8783号公報;特開昭59-68673号公報;特開昭61-87680号公報;特開昭61-200988号公報;特開昭64-47952号公報;特表昭64-500458号公報;特開平1-127957号公報;米国特許明細書第 4,374,120号 (USP No.4,374,120) などに記載あるいはそこで引用された文献に記載され、それらが適用できる他、それらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。時間分解蛍光測定法では、希土類元素、より好ましくはランタニドが挙げられ、例えば Eu (III), Tb (III)などが形成するキレー



トの強い蛍光を利用することができる。

【0021】本発明に従った免疫学的測定の具体的な態様では、

① 第1反応：抗マウスIgG 抗体を結合したプラスチックウェル(A) にダイオキシン含有試料 (サンプル)(B)と抗ダイオキシンモノクローナル抗体 (C)を入れて反応させる。すると、〔プラスチックウェル結合抗マウスIgG 抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-ダイオキシン〕の免疫複合体が形成される。

② 第2反応：該免疫複合体にヨーロッパウム(Eu)標識ダイオキシン(D) を反応させると、未反応の抗ダイオキシンモノクローナル抗体とEu標識ダイオキシンが反応し、〔プラスチックウェル結合抗マウスIgG 抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-Eu標識ダイオキシン〕の免疫複合体が形成される。

③ 第3反応：エンハンサー(E) を加え、免疫複合体中のEuの量を時間分解蛍光測定機で測定し、その得られた値を基に予め作成しておいた検量線から、サンプル中のダイオキシン量を読み取る。本免疫学的測定に適した試薬としては、例えば、ハイブリザイム社、米国から入手できるものが挙げられる。本発明にしたがえば、例えば2,3,7,8-TCDDなどその毒性などが特に問題とされているダイオキシン類及び／又はPCB 類の評価のためのデータを迅速且つ簡単な手法で短時間に得ることができる。また、多数のサンプルの分析測定処理にも対応できるという利点がある。免疫学的測定法では、その測定自体に高価な測定機器を必要とされることもなく、さらにそのデータの解析・評価に（特に、TEQ を得るなど、その毒性などと関係したデータの取得に）、GC-MS のようには格別な技能が要求されるということもなく、殆ど誰でも扱えるといった汎用性が高いという利点も認められる。また、免疫学的測定装置としては、当業者に知られたものを本ダイオキシン測定に適合しうるようにしたものであってよい。そうした装置は、CPU 及びメモリーを搭載したコンピューターを備えたものであってよく、そうした装置は予め決められたプログラムに従い、最適な測定を行うことができるように設定できる。また該装置は、その操作を自動化できると共に、個々の試料毎に測定条件を変えることも可能であり、所要の処理を自動化並びにプログラム制御したものが好ましく使用できるが、本発明にしたがって有利な利点が得られるならば特に限定されることはない。本発明では試料(サンプル) から溶剤を用いてダイオキシン類及び／又はPCB類を抽出する第一工程、抽出液中に含まれる物質とダイオキシン類及び／又はPCB類を分離する第二工程、分離したダイオキシン類及び／又はPCB類を分析定量する第三工程を含む一連の工程からなるダイオキシン類及び／又はPCB類の測定法にあって、それぞれ利点のある各手段を採用し、それを一体としたシステムとして運用することにより、全体としても簡易迅速な測定を実現できるなどの格

別の利点が得られる。免疫学的測定法を利用しながら、従来法(公定法)と変わらないかあるいはそれに匹敵する結果(高い相関性のある結果)を得ることができる。

【0022】

【実施例】以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。

【0023】実施例1 ばいじん中のダイオキシンの測定と回収率の検討

1) ダイオキシン類の抽出

ばいじん(ばいじんA) 2 g を ASE200 (ダイオネクス社製)用 11 mLセルに入れる。ASE200の使用マニュアルに従い、抽出溶媒として 5 %酢酸含有トルエンを用いて 150 °C、2000 psi、15分間 2 サイクルの抽出条件で抽出を行った。抽出により得られた 24 mLの抽出液を遠心型エバポレータを用いて乾燥させ 5 %酢酸含有トルエンを除去したのち、ヘキサン 10mL に残留物を溶解し、抽出液Aを得た。この操作に、100 分間が必要であった。また、ばいじんA 2 gに、5 ng/mL の 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ダイオキシンを含むヘキサン溶液0.5 mL を添加しヘキサンを蒸発させたばいじんBを同様に抽出、エバポレート、ヘキサン溶解し、10 mL の抽出液Bを得た。

【0024】2) 多層シリカゲルカラムの調製

出口に内径4 mm、長さ1 cmの円筒状ガラス管を備えた内径15 mm、長さ10 cmの円筒状ガラスカラムに、直径16 mmの円形状に成形した厚さ 0.45 mmの石英繊維フィルター(ワットマン社製)をフィルターの淵がカラム外壁に接触するように入れた。このカラムにシリカゲル0.09 g、2 % 水酸化カリウム被覆シリカゲル0.3 g、シリカゲル0.09g、44 %硫酸被覆シリカゲル0.45 g、22 %硫酸被覆シリカゲル0.60g、シリカゲル0.09g、10 %硝酸銀被覆シリカゲル0.3 g、硫酸ナトリウム0.6 g を出口側から順番に積層し、直径16 mmの円形状石英繊維フィルターを硫酸ナトリウムの上にかぶせた。本カラムは予め作製してデシケータ内に保存しておいた。

【0025】3) アルミナカラムの調製

出口に内径2 mm、長さ1 cmの円筒状ガラス管を備えた内径9.6 mm、長さ15 cmの円筒状ガラスカラムに、直径10.0 mmの円形状に成形した厚さ0.45 mmの石英繊維フィルター(ワットマン社製)をフィルターの淵がカラム外壁に接触するように入れた。このカラムにアルミナ(活

性度1)を2.5 g、硫酸ナトリウム1.0 gを出口側から順番に積層し、直径10 mmの円形状石英繊維フィルターを硫酸ナトリウムの上にかぶせた。本カラムは予め作製してデシケーター内に保存しておいた。

#### 【0026】4) サンプルのクリーンアップ

多層シリカゲルカラムにヘキサン 20 mLを流し、カラムを洗浄した。次いで、抽出液Aをチャージし、溶出液を採取する。次いで、ヘキサン50 mLを用いて洗浄し、溶出液を採取して先程の溶出液と混合した。この操作に90分間が必要であった。次にアルミナカラムをヘキサン10 mLを流し、カラムを洗浄した。次に、得られた溶出液を全量チャージし、次いでヘキサン10 mL、2%ジクロロメタン含有ヘキサン20 mLで洗浄する。次いで、50%ジクロロメタン含有ヘキサン20 mLでカラムを洗浄し、溶出液を採取した。この溶出液を遠心型エバポレータを用いて乾燥させ50%ジクロロメタン含有ヘキサンを除去したのち、メタノール 0.2 mLに残留物を溶解し、測定 \*

\* 用検体Aを得た。この操作に120分間が必要であった。同様の操作を抽出液Bについても行い、測定用検体Bを得た。

#### 【0027】5) 検体の免疫測定

時間分解蛍光免疫測定法の原理に基づくダイオキシン免疫測定キット(ハイブリザイム社製)を用い、0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mLの各濃度の2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン標準液及び測定検体A、測定検体Bを測定し、標準から作成した検量線を用いて、測定検体A及び測定検体Bの濃度を読みとった。得られた濃度からばいじん中のダイオキシン量及び回収率を計算し、表1に示した。本法では、86%と高い回収率が得られた。この操作に40分間が必要であり、ダイオキシンの測定のためにトータル350分が必要であった。

#### 【0028】

#### 【表1】

項目	
ばいじんA (2 g中) ダイオキシン量	1.20 ng
ばいじんB (2 g中) ダイオキシン量	3.34 ng
2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン添加量	2.50 ng
回収率	86%

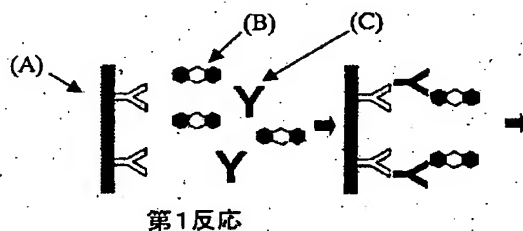
【0029】上記ダイオキシン免疫測定キットの測定原理は次のようなものである：

第1反応： 抗マウスIgG抗体を結合したプラスチックウェル(A)にダイオキシン含有サンプル(B)と抗ダイオキシンモノクローナル抗体(C)を入れ反応させると【プラスチックウェル結合抗マウスIgG抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-ダイオキシン】の免疫複合

体が形成される。

#### 【0030】

#### 【化1】

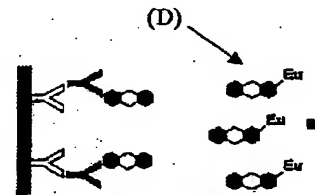


【0031】第2反応： 該生成複合体にヨーロッパウム(Eu)標識ダイオキシン(D)を反応させると、未反応の抗

ダイオキシンモノクローナル抗体とEu標識ダイオキシンが反応し、【プラスチックウェル結合抗マウスIgG抗体-抗ダイオキシンモノクローナル抗体-Eu標識ダイオキシン】の免疫複合体が生成する。

#### 【0032】

#### 【化2】

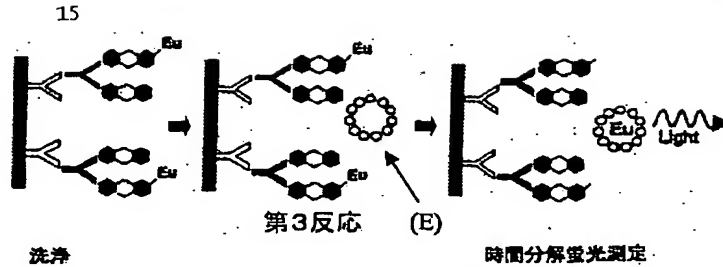


【0033】第3反応： エンハンサー(E)を加え、免疫複合体中のEuの量を時間分解蛍光測定器で測定する。あらかじめ作成した検量線から、サンプル中のダイオキシン量を読みとる。

#### 【0034】

#### 【化3】





以上の結果を基に検討したところ、測定対象試料を採取して後、含有ダイオキシン類及び／又はPCB類の測定を依頼され、その測定を行って結果報告までに要する時間は、従来法（公定法）では約1カ月半程度を要するのに対し、本発明の測定システムでは、約1週間程度と大幅に期間短縮を図ることができると評価された。

#### 【0035】実施例2 相関性

本発明の方法でダイオキシン類濃度を測定した結果と、「特別管理一般廃棄物及び特別管理産業廃棄物に係る基準の検定方法」（平成4年7月厚生省告示第192号 改正：平12厚生告6号）別表第1に準じた方法で測定した結果を比較した。

##### 1) 従来の測定方法での測定

「特別管理一般廃棄物及び特別管理産業廃棄物に係る基

\* 準の検定方法」別表第1に準じた方法で3検体のばいじんの測定を行った。ダイオキシン類の濃度は、各ダイオキシン類の毒性係数を乗じて算出したTEQで表した。

##### 2) 本発明法での測定

実施例1と同様の方法で、3検体のばいじん（ばいじんC：0.99 g、ばいじんD：2.0 g、ばいじんE：3.83 g）に含まれているダイオキシン類量の測定を行った。ASE200の抽出に用いるセルは、検体の量に応じて、11 mLまたは22 mLのセルに変えて用いた。結果を表2に、相関性を図3に示した。この結果、相関係数0.99と高い相関性が得られた。

#### 【0036】

【表2】

サンプル名	従来の方法	本発明の方法
	(ng-TEQ/g)	(ng/g)
ばいじんC	25	5.25
ばいじんD	2.55	0.60
ばいじんE	0.96	0.22

本発明の免疫学的測定法によれば、簡単な操作で、対象とする問題の多いダイオキシンを迅速に多数の検体につき測定できる。

#### 【0037】

【発明の効果】本発明により、様々な試料を対象にして、簡単且つ短時間にダイオキシン類及び／又はPCB類の迅速測定が可能となる。また迅速測定が可能であることから、大量の検体を従来に比し非常に短時間に扱うことが可能であり、また省力化にも大きく貢献するが、一方で毒性などに問題の大きいダイオキシン類についての測定結果を信頼性をもって得ることができる。特に、免疫学的測定により測定対象ダイオキシン類に対して特異的な測定が可能であることから、簡易クリーンアップ処理と組み合わせても、その得られる値が十分に満足できるものが得られ、さらにその測定操作においても測定実施者の熟練度をそれ程問題にすることなしに、満足のいく結果を得ることができる。本発明により、ダイオキシン類及び／又はPCB類の測定が低コストで行うことができる。本発明では、簡易クリーンアップ処理を予め

バックしておいた多層充填剤充填カラムを使用することにより、汚染されている充填剤を測定実施者が測定のために洗浄してカラムにバックするといった煩雑で且つ注意を要する操作を省くことができ、また廃棄された使用済みカラムもまとめて再生及び／又は廃棄処理に付すことができるので、低コスト化並びに安全性の面でもその貢献するところが大きい。またクロマトグラフィー処理の効果についても、そのバラツキを排除して安定したクリーンアップ効果を期待できることとなる。本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

#### 【図面の簡単な説明】

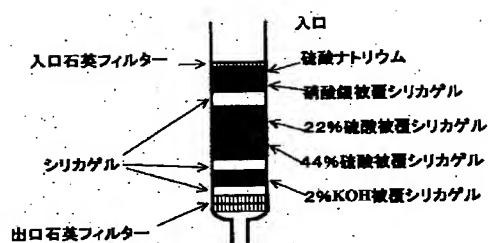
【図1】多層シリカゲルカラムの部分断面正面図である。

る。

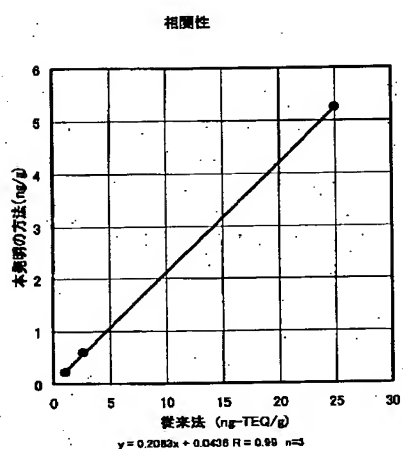
【図2】アルミナカラムの部分断面正面図である。

【図3】従来の方法と本発明の方法とのダイオキシン測定における相関関係を示す。

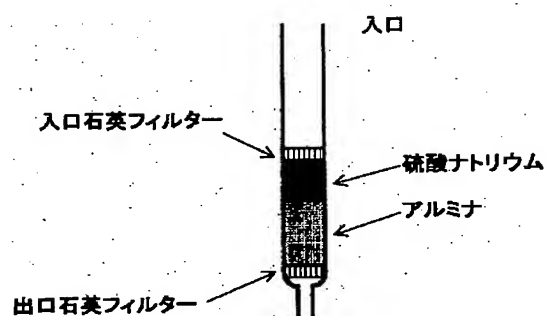
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 多田 雅人  
富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工  
業株式会社内

(72)発明者 岡本 巧誠  
富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工  
業株式会社内

Fターム(参考) 4D017 AA03 BA03 CA05 CB01 DA03  
EA01  
4D056 AB18 AC03 AC08 AC09 BA16  
CA05 CA21 CA22 CA31